

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-132033

(43)Date of publication of application : 23.05.1995

(51)Int.Cl.

A01K 67/027
C12N 15/09

(21)Application number : 05-306026

(71)Applicant : HOECHST JAPAN LTD

(22)Date of filing : 12.11.1993

(72)Inventor : SATO MASAHIRO

KOBAYASHI TAKASHI

TADA NORIHIRO

SHOJI MIKIO

KAWARABAYASHI TAKESHI

(54) TRANSGENIC ANIMAL FOR ALZHEIMER'S DISEASE MODEL

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide the transgenic animal capable of being utilized for testing the effect of a medicine relating to an ability for reducing the characteristic parameters of the Alzheimer's disease, such as a β -protein antibody-resistant reactive substance formed in the brain of an animal.

CONSTITUTION: An Alzheimer's disease model transgenic animal comprises a human being excluding mammalian into each of whose body cells or genital cells a recombinant cell containing (1) the DNA sequence of a β -actin promoter, (2) the DNA sequence of a cytomegalovirus enhancer, (3) a DNA sequence coding the signal peptide of a human β -amylid precursor protein, and (4) a DNA sequence coding the C-terminal peptide of the human β -amylid precursor protein has been inserted, the C-terminal peptide having the length of 99-103 amino acid residues.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 11.10.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 11.11.2003

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or

632

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-132033

(43)公開日 平成7年(1995)5月23日

(51)Int.Cl.⁴
 A 01 K 67/027
 C 12 N 15/09

識別記号 庁内整理番号
 9123-2B
 9050-4B

F I
 C 12 N 15/ 00

技術表示箇所
 A

審査請求 未請求 請求項の数6 FD (全17頁)

(21)出願番号 特願5-306026
 (22)出願日 平成5年(1993)11月12日

(71)出願人 000113137
 ヘキストジャパン株式会社
 東京都港区赤坂8丁目10番16号
 (72)発明者 佐藤 正宏
 埼玉県川越市南台3丁目7番10号 ヘキス
 トジャパン社有社宅102号室
 (72)発明者 小林 隆志
 福岡県福岡市博多区大博町7丁目9番地
 ダイナコート大博通り1003号室
 (72)発明者 多田 昇弘
 埼玉県川越市南台3丁目7番10号 ヘキス
 トジャパン社有社宅201号室
 (74)代理人 弁理士 高木 千嘉 (外2名)
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アルツハイマー病モデルトランスジェニック動物

(57)【要約】

【構成】 1) ベータアクチンプロモーターのDNA配列、

2) サイトメガロウイルスエンハンサーのDNA配列、
 3) ヒトベータアミロイド前脳部蛋白のシグナルペプチドをコードするDNA配列、および

4) ヒトベータアミロイド前脳部蛋白の99ないし103個のアミノ酸残基長のC末端ペプチドをコードするDNA配列を含むことを特徴とする組み換え遺伝子が、体細胞および生殖細胞に組み込まれた、ヒト以外の哺乳動物であるアルツハイマー病モデルトランスジェニック動物。

【効果】 本発明のトランスジェニック動物は、動物脳内に形成される抗ベータ蛋白抗体反応性物質等のアルツハイマー病特有のパラメーターを減少させる能力に関する薬剤の効果検定に利用できる。

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 1) ベータアクチングロモーターのDNA配列。

2) サイトメガロウイルスエンハンサーのDNA配列。

3) ヒトペータアミロイド前駆体蛋白のシグナルペプチドをコードするDNA配列。および

4) ヒトペータアミロイド前駆体蛋白の9ないし10

3個のアミノ酸残基長のC末端ペプチドをコードするD

NA配列を含むことを特徴とする組み換え遺伝子が、体

細胞および生殖細胞に組み込まれた、ヒト以外の哺乳動物であるアルツハイマー病モデルトランジジェニック動物。

【請求項2】 ヒトペータアミロイド前駆体蛋白のシグ

ナルペプチドが、配列表の配列番号1のペプチドである

請求項1のアルツハイマー病モデルトランジジェニック動物。

【請求項3】 1) ベータアクチングロモーターのDNA配列。

2) サイトメガロウイルスエンハンサーのDNA配列。および

3) ヒトペータアミロイド前駆体蛋白の9ないし10

3個のアミノ酸残基長のC末端ペプチドをコードするD

NA配列を含むことを特徴とする組み換え遺伝子が、体

細胞および生殖細胞に組み込まれた、ヒト以外の哺乳動物であるアルツハイマー病モデルトランジジェニック動物。

【請求項4】 ヒトペータアミロイド前駆体蛋白のC末端ペプチドが、

1) 配列番号2のアミノ酸配列を有する、正常ヒトペ

タアミロイド前駆体蛋白のペプチド。

2) 配列番号3のアミノ酸配列を有する、22番目のグルタミン酸がグルタミンに変換した変異体ペプチド。

3) 配列番号4のアミノ酸配列を有する、46番目のバ

リンがイソロイシンに変換した変異体ペプチド。

4) 配列番号5のアミノ酸配列を有する正常ヒトペ

タアミロイド前駆体蛋白のペプチド、または

5) 配列番号6のアミノ酸配列を有する、3番目のリジンがアスパラギンに、4番目のメチオニンがロイシンに

変換した変異体ペプチドから選ばれる請求項1～3のアルツハイマー病モデルトランジジェニック動物。

【請求項5】 海馬領域において以下の組織病理学的特徴、

1) ベータアミロイド前駆体蛋白質C末端ペプチドの大

量合成、

2) CA領域の海馬錐体細胞での神経細胞死、

3) グリア細胞の増加、および

4) 異常リン酸化タウ蛋白質の沈着を有する、請求項1

～4のアルツハイマー病モデルトランジジェニック動物。

【請求項6】 マウスである請求項1～5のアルツハイ

50

マー病モデルトランジジェニック動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、一般的に疾患の治療に関連した薬の開発に有効な動物モデルに関するものである。更に詳しくは、ベータアミロイド前駆体蛋白（ β -amyloid precursor protein, APP; 以後、これをAPPと呼ぶ）の一部をコードする外來性遺伝子構築体を自らのゲノムに取り込んだトランジジェニック（transgenic）動物の作製に関するもので、その中で、外來性遺伝子構築体をどの細胞タイプでも広く過剰発現させるよう仕組まれている。

【0002】

【従来の技術】 最近の発生工学の発展により、外來性遺伝子（DNA）を胚の核内へ注入するか感染させるこ

とにより、胚の染色体にその物質を組み込んだ胚（いわゆる形質転換胚）を作ることができるようにになった（Gordon J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, vol. 77, p. 7380-7384, 1980; Jaenisch R. et al., Cell, vo

20 1, 32, p. 209-216, 1983）。この胚は、仮親（里親）に移植することにより、成長させることができ、得られた成体動物は外來性DNAを自らの染色体に取り込んでおり、且つそれを発現することができる。形質転換された個体は、一般的にトランジジェニック動物と呼ばれる（Gordon J. and Ruddle F., Science, vol. 214, p. 1244-1246, 1981）。取り込まれた外來性DNAは、トランジ

ーン（transgene）と呼ばれ、一般的にプロモーターとcDNA等の目的遺伝子から成る。外來性DNAの発現は、成体にならずとも発現することができ、例えば、胚の細胞分裂過程でも発現する場合がある。従つて、その発現の結果、外來性DNAによりコードされる蛋白が生産され、特にその蛋白が生体にとって重要な機能を果たしているなら、その個体の発生の異なる時点では、個体の表現型に何らかの変化を引き起こすこともあり得る。表現型の変化を与える様式としては、個体で発現させるべき目的蛋白の過剰発現か、内在性の目的蛋白の発現の抑制があり、それを制御するには、目的蛋白をコードする遺伝子の上流側に置かれているプロモーターがエンハンサーである。尚、発現抑制の仕方としては、アン

チセンス法（Katsuki M. et al., Science, vol. 241, p. 593-595, 1988）等が挙げられる。

【0003】 個体が外來性DNAで形質転換された、あるいはその結果、本来の表現型が変わったという報告は、これまでに多くされており、特にPalmiter R.D. and Br

instler R.L. (Annu. Rev. Genet., vol. 20, p. 465-499, 1989) や Gordon J.W. (Int. Rev. of Cytobiol., vo

l. 115, p. 171-229, 1989) 等の総説に詳しく述べられて

いる。このトランジジェニック動物は、1) 発生過程での遺伝子発現のin vivoでの解析、2) 遺伝病の克服または軽減に向けた研究等の分野で利用されうる。外來性D

NAによる胚の形質転換は、外來性DNAを外から与えることにより、最終的に胚内の染色体内のDNA配列の一部に組み込まれることにより達成される。これを達成するにはいくつかの方法があるが、例えば、外來性DNAを微小ビペットに吸いし、これを1細胞期の前核内へ注入する方法、所謂、顕微注入法(Gordon et al., 1980)が一般的である。

【0004】DNAを注入された胚はついで、偽妊娠雌の生殖道(輸卵管または子宮)に移植することにより、1個の生命体へと発生させることができる。この生命体は後日、外來性DNAを自らの染色体に取り込んでいるかどうか、PCR法やサザンプロット法等で解析されることとなる。もしこの取り込みが確認されたら、この動物はin vivoにおける遺伝子発現解析(例えば、ノーザンプロット法や免疫抗体法等による解析)に利用される。この発現により、ヒトのある遺伝病に似た形質を引き起こすことも可能である。

【0005】アルツハイマー病には、一説では後に述べるように、APPの過剰発現が関連すると考えられている(Terry R. D. and Katzman R. Ann. Neurol. vol. 14, p. 496-506, 1983)。アルツハイマー病患者脳には、アルツハイマー病特有の神経原線維変化[neurofibrillary tangles (NFT), paired helical filaments (PHF):以後これをPHFと呼ぶ]、老人斑(neuritic plaqueまたはsenile plaque)及び脳アミロイド(amyloid)の沈着があり、脳アミロイドはAPPから生じるからである。しかも、最近では、後で述べる家族性アルツハイマー病や遺伝性脳血管アミロイドアンゴババー(amyloid angiopathy)でAPPの遺伝子異常が発見されたことや、脳内に沈着したアミロイドの主成分であるアミロイドプロテアーカコ蛋白(amyloid plaque core protein; APP)あるいは、アミロイドコア蛋白(β -amyloid core protein)(後日、このポリペチドはベータ蛋白または β /A 4蛋白と命名される)。以後、これを β /A 4蛋白と呼ぶ)自体が神経毒性を有するという報告(Yankner B. A. et al., Science, vol. 245, p. 417-420, 1989)等から、APPから β /A 4蛋白が代謝され、沈着する機序の解明がアルツハイマー病の病因解明の最も本質的なアプローチと考えられている。しかし、残念ながら、これまでアルツハイマー病のモデルとなる動物が知られていないか、あるいは、確立されていないため、このような仮説を立証する手立てがなかった。そこで、人为的にAPP遺伝子を組み込ませたトランジジェニック動物を作り、このAPPをトランジジェニック動物脳内で過剰発現させ、アミロイド沈着を引き起こした結果、最終的にアルツハイマー病に似た動物、所謂ヒトアルツハイマー病モデルができる可能性がある。

【0006】最近、ヒトのAPP cDNAの全長あるいは一部分を過剰発現させることにより、脳内のアミロイド沈着を引き起こしたトランジジェニックマウスがいく

つかの研究室から相次いで報告された(Kawabata S. et al., Nature, vol. 345, p. 476-478, 1991; Quon D. et al., Nature, vol. 352, p. 239-241, 1991; Wink D. O. et al., Science, vol. 253, p. 323-325, 1991)。しかし、Kawabataらの報告は、その後、追試に成功せず、論文は撤回された(Nature, vol. 356, p. 265, 1992)。

更に、Winkらの報告も、その形質変化はトランジジェンによるものではないということである(Science, 28, Feb., 1992)。特許出願でもいくつかのアルツハイマー病モデルトランジジェニック動物を確立したという報告が、例えばWO 93/14200, WO 93/02189, WO 92/13069, WO 92/06187, WO 91/19810, EP 4517000 およびWO 89/06689として公開されているが、いずれも遺伝子の構築だけであったり、得られたトランジジェニック動物で単にAPPの沈着がみられたといった間接的な説明しかない。従って、現在のところ、はっきりとしたアルツハイマー病モデル動物は確立されていないと思われる。これに対し、本発明で作出されたトランジジェニック動物は、アルツハイマー病に伴う様々な症状と類似した形質を示しており、この意味では本発明で作出されたトランジジェニック動物は、アルツハイマー病の発症原因の解明のための実験系を提供し、また、アルツハイマー病発症の阻止、あるいは、アルツハイマー病発症に伴う神経細胞死等を阻止するようなアルツハイマー病治療薬を開発するための系を提供し得るものと言える。

【0007】前にも述べたように、アルツハイマー病と関連した形態学的、病理学的変化としては、PHFの形成及び脳アミロイドの沈着の2点がある。PHFはアルツハイマー病以外の神経性疾患にも出現するが、神経と神経の間に見られるアミロイド沈着、所謂、老人斑及び脳血管周囲にも沈着するアミロイド沈着は、アルツハイマー病特異的と考えられている。特に、老人斑は高齢者のダウノン症候群患者脳(アルツハイマー病も発症させている)でも見られる。老人斑アミロイドを構成する主要蛋白は、部分的に精製され、約4.1 kDaの3~42個のアミノ酸から成る β /A 4蛋白から成ることが判明した(Glimmer G. and Wong C. W., BBRC, vol. 120, p. 131-135, 1984)。このアミノ酸配列は決定され(Glimmer G. and Wong C. W., 1984; Masters C. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, vol. 82, p. 4245-4249, 1985)、そのアミノ酸配列はこれまで報告されている蛋白のものと全く異なるものであった。

【0008】近年、ヒト胎児脳組織cDNAライブラリより β /A 4蛋白を含む比較的大きなサイズの蛋白(前駆体)をコードするcDNAが単離され、そのDNA配列解析から、695個のアミノ酸より成る(この蛋白をA 695という)こと、 β /A 4蛋白は、アミノ酸配列597~695の位置に相当することがわかった

(Kang J. et al., *Nature*, vol. 325, p. 733-736, 1987)。更に、A695以外にも、もっと大きいサイズのAPP cDNA (A751, A770) が報告された (Kitaguchi et al., *Nature*, vol. 331, p. 530-532, 1988)。このA751蛋白はA695に56個分のアミノ酸が付与されたもので、この特殊なインサートは、クニツファミリー (Kunitz family) のセリンプロテアーゼインヒビター (serine protease inhibitor) (以下KPIと呼ぶ) に非常に高い同様性を示す (Kitaguchi et al., 1988)。一方、A770蛋白は、A751の57個のインサートのすぐ後にMRC OX-2抗原に同様性の高い19個分のアミノ酸が挿入されたタイプである。これらA751、A770は、全身臓器に多く発現している。尚、この3者は、同一の遺伝子 (APP) からアルターナティブスプライシング (alternative splicing) によって生じることが示されており (Kitaguchi et al., 1988; Ponte P. et al., *Nature*, vol. 331, p. 525-527, 1988; Tanz R. et al., *Nature*, vol. 331, p. 528-530, 1988)、いずれもC末端から99番目の間に $\beta/A4$ 蛋白部分を有すること (28アミノ酸は細胞膜外に、11-14アミノ酸は細胞膜内に存在) から、脳内のアミロイド沈着に関係する蛋白をコードするものと考えられる。

【0009】アルツハイマー病患者脳におけるAPPの脳内局在を、APPのいくつかの部位に対する数種の抗体を作製し、免疫組織化学的に検討すると、老人疾患等が染められることが解かった (Wong C.W. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, vol. 82, p. 8729-8732, 1985; Allison D. et al., *Neurosci. Letter*, vol. 68, p. 252-256, 1986; Shoji M. et al., *Brain Res.*, vol. 512, p. 164-168, 1990a; Shoji M. et al., *Am. J. Pathol.*, vol. 137, p. 1027-1032, 1990b; Shoji M. et al., *Brain Res.*, vol. 530, p. 113-116, 1990c)。従って、アルツハイマー病患者脳で見つかった老人斑を構成するアミロイド蛋白はこれら抗体により認識されると言える。これらの抗体を用いて、例えば、APPのある動物の脳内で強制発現させた場合、APPとその代替分画蛋白の神経における局在性を追跡することができる。

【0010】APPは全身臓器に広範に発現する蛋白であり、また、蛋白進化の過程でもよく保存された蛋白である (マウスとヒトでは、アミノ酸レベルで97%の一一致が見られる) ことから、細胞間接着 (cell-cell adhesion) や細胞分化等に重要な役割を果たしているものと想定されたが (Shivers B.D. et al., *EMBO J.*, vol. 7, p. 1365-1370, 1988)、正確な役割は未だに不明である。最近、 $\beta/A4$ 蛋白が未分化な海馬神経細胞に対し、低濃度では神経栄養因子として働く一方、成熟した神経細胞に対しては、高濃度では神経毒性として働くことが示され、注目されている (Yankner B.A. et al., 1989)。この実験系では、栄養因子と神経毒性として働く部分は、 $\beta/A4$ 蛋白の25-35番目のアミノ酸に

相当し、この部分はタヒキニン系のペプチドと相同性があることが示された (Yankner B.A. et al., 1989)。これに関連して興味深いのは、 $\beta/A4$ 蛋白を大脳皮質または海馬内へ注入すると、この現象が *in vivo* においても起こること、及びP亨の構成成分である異常病理性タウ (tau) 蛋白の生成が誘導された点である (Kowall N.W. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, vol. 88, p. 7247-7251, 1991)。従って、 $\beta/A4$ 蛋白蓄積とP亨蛋白の深い関連が示唆された。更に、もっと最近では、APPのC末端側の細胞内部位は、プロテイキナーゼCやCa²⁺/カルモジュリン依存性プロテイキナーゼIIにより磷酸化され (Gandy S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, vol. 85, p. 6218-6221, 1988)、また、細胞膜直下に存在する主要GTP結合蛋白であるG0とAPPが相互作用するという報告 (Nishimoto I et al., *Nature*, vol. 362, p. 75-78, 1993) もあり、APPがシグナル伝達にも関与する可能性が指摘されている。

【0011】APP遺伝子はヒトの場合、第21染色体の長腕に存在することが知られている (Goldgaber D. et al., *Science*, vol. 235, p. 877-880, 1987)。近年、家族性アルツハイマー病 (familial Alzheimer's disease) のうち、早期発症型 (発症年齢が65歳以下のもの) 家系において、APPのアミノ酸番号642 (Kang J. et al., 1987) の配列に基づく; 以下、APPの塩基配列、アミノ酸配列はKang J. et al., 1987に基づいて表してある) にValからIleへの突然変異が発見された (Goate A. et al., *Nature*, vol. 349, p. 704-706, 1991; Naruse S. et al., *Lancet*, vol. 337, p. 978-979, 1991; Yoshioka K. et al., *BBRC*, vol. 178, p. 114-116, 1991; Hardy J. et al., *Lancet*, vol. 337, p. 1342-1343, 1991)。更に、同じアミノ酸部位にPh e、Glyという他のアミノ酸への突然変異が発見された (Murrell J. et al., *Science*, vol. 254, p. 97-99, 1991; Chartier-Harlin M-C et al., *Nature*, vol. 353, p. 844-846, 1991)、家族性アルツハイマー病の発症にこのValの変異が重要な役割を果たしていると考えられている。また、オランダ型 (Dutch-type) の遺伝性脳出血に伴うアミロイド沈着の場合、 $\beta/A4$ 蛋白の内部、即ちAPPのアミノ酸番号618からGluからGlnへの突然変異がみられる (Levy E. et al., *Science*, vol. 1, 1248, p. 1124-1126, 1990)。更には、 $\beta/A4$ 蛋白のN末端側の2個のアミノ酸の変異 (アミノ酸番号595のLysがAsnへ、及びアミノ酸番号596のMetがLeuへ変換) がスウェーデンの家族性アルツハイマー病と関連することが提唱され (Mullan M. et al., *Nature Genet.*, vol. 1, p. 345-347, 1992)、このタイプはスウェーデン型突然変異と呼ばれる。このようにAPPに関する分子生物学的解析は進んだが、アルツハイマー病患者脳で何故アミロイドが蓄積され、沈着するか、そして、 $\beta/A4$ 蛋白の蓄積によりどのように神経細胞が変

性していくのかというメカニズムについては何ら有効な情報は未だない。

【0012】現在、最も問題となっているのは、脳内にアミロイド沈着が生じるためには、APPのどのような代謝経路に問題があるのかで、詳細に検討され始めている。例えば、APP cDNAを導入したヒト胎児性腎臓(embryonic kidney)細胞293株から、膜結合型末端分画9kDaを抽出し、そのC末端のアミノ酸配列を決定した結果、 $\beta/A4$ 蛋白部分のN末端から16番目のLysでAPPが切断されていることが解かった(Esch F.S. et al., Science, vol.248, p.1122-1124, 1990)。しかし、脳アミロイドとして沈着するには、APPは $\beta/A4$ 蛋白部分のN末端とC末端で切断され聚集することが必要であり、Eschらの明らかにした代謝系では不活性の $\beta/A4$ 蛋白は生成されて来ない。この点から更に、様々な代謝系が異なるが推定されているが、未だ明らかな結果は得られていない。現在のところ、APPのプロセッシングには、1) APPを $\beta/A4$ 蛋白部分の1.5番目のアミノ酸で終わる分子量100kDa以上の分泌性派生体(secreted derivative)とC末端側の低分子蛋白とに分解される、いわゆる分泌経路(secretary pathway)、2) $\beta/A4$ 蛋白の部分を全長の形で含む末端側の様々な大きさのペプチドを生成する、いわゆるエンドソーマル/リソゾマル経路(endosomal/lysosomal pathway)の2つがあると考えられている(Goldie T.E. et al., Science, vol.235, p.728-730, 1992)。

【0013】従って、上記家族性アルツハイマー病型、オランダ型、及びスウェーデン型のAPP遺伝子上の3箇所の突然変異が生じた際に、これら2つの代謝経路はどのように影響されるのかという点はまだ解決されていないが、これらAPPアノログはAPPのプロセッシングの経路をエンドソーマル/リソゾマル経路に積極的に変える構造を持つものと想定される。この意味では、これらAPPアノログを過剰発現するトランジエニック動物システムは、APPのプロセッシング機構を明らかにするための有用な材料を提供するものである。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、APPの合成に関する分子機構、詳しくは、APP合成後のAPPのプロセッシングに関する分子機構解明する方法を提供するものである。更に重要なことは、 $\beta/A4$ 蛋白の合成と沈着を阻止するための薬剤のin vivoスクリーニング系を提供するものである。

【0015】

【課題を解決するための手段】アルツハイマー病に関連したAPPをコードするDNA断片を哺乳動物好ましくはマウスの1細胞期胚の前核に顯微注入し、次いでこの注入された胚は、偽虹彩メスに移植され、トランジエニック動物出産へと至る。このトランジエニック動物

は、アルツハイマー病に関連するAPP蛋白を過剰発現すると考えられる。注入されたDNAには、トランジエニック動物の非特異的で様々なタイプの細胞で目的の蛋白を発現せしめるようなプロモーターが含まれている。 $\beta/A4$ 蛋白はAPPのC末端側領域から生成されるので、APPのC末端側領域のみの大量発現は、 $\beta/A4$ 蛋白の形成を促進し、その結果として、特有の神経の退化及び老人斑の形成等が始まると考えられる。

【0016】本発明の重要な点は、 $\beta/A4$ 蛋白を含むAPPのC末端側領域を強力なプロモーターの制御の下、神経やそれ以外のどのタイプの細胞でも過剰発現させることができるとある。そして、その結果、アルツハイマー病特有の海馬におけるアミロイドの沈着、構造化タウ蛋白の出現、グリア細胞の増加、海馬付近における神経細胞死。更には、動物の活動的な行動の低下が引き起こされる点である。また、内性のAPP mRNAのアルターナティブスプライシングのパターンの変化もこの発現によって引き起こされる点である。更に、本発明の重要な点は、 $\beta/A4$ 蛋白の中で最終箇所アミノ酸の置換を持つアノログをコードするDNA配列を有するトランジエニック動物を作出した点である。これにより、APPのエンドソーマル/リソゾマル経路におけるプロセッシングに変化をきたし、プロテアーゼの活性特異性が変わるように蛋白が生じる可能性があり、その結果、脳内での大量のアミロイドの蓄積が望まれる。

従って、本発明で紹介されたトランジエニック動物は、APP蛋白とプロテアーゼとの相互作用、あるいは、内性APPと導入された外性蛋白同志の相互作用等をin vivoで研究するための有用な系を提供するものであり、また、アルツハイマー病治療薬の探索にも利用できるものである。

【0017】本発明の目的は、 $\beta/A4$ 蛋白に相当するAPPのC末端側領域、及びそのアノログを神経細胞や他の細胞に強力に発現せしめるために必要なDNA配列、所謂、組み換えDNAを有するトランジエニック動物を提供することであり、本発明の有用性としては、このトランジエニック動物がアルツハイマー病の病因解析及びアルツハイマー病治療薬のin vivoスクリーニングのために用いることができる点である。本発明の特徴としては、このトランジエニック動物がAPPの大量合成、構造化タウ蛋白の出現、グリア細胞の増加、神経細胞死等の一連のアルツハイマー病特有の症状を示すため、これまで知られているAPP遺伝子導入トランジエニックマウスに比べ、よりアルツハイマー病に近い動物モデルであると言える。本発明をより具体的に説明するため、以下に実施例を示す。

【0018】

【実施例】次に掲載する実施例は、DNA配列、融合(fusion)構造体、トランジエニックマウス等をどのように作るか等を完全に開示し、記載することを目的と

したものだが、これによって本発明が実施例に限定されるものではない。

【0019】実施例1

トランシージェニックマウスで発現されるべきプラスミド $p\beta\alpha/\Delta NOR\beta$ 、 $p\beta\alpha/FAD\beta$ 、 $p\beta\alpha/D\beta$ 、 $p\beta\alpha/\Delta NOR\beta$ 及び $p\beta\alpha/NL\beta$ の構築マウスで発現させるべき目的遺伝子は以下のようによく作成した。正常なヒトAPPcDNAのシグナルペプチド(アミノ酸番号1番目から17番目)と β ヘム4蛋白に相当するAPPのC末端側(アミノ酸番号597番目から695番目)との融合遺伝子(これをNOR β と呼ぶ)をHorton R.M. et al (Gene, vol.77, 61-68, 1989)の方法によく作成した。先ず、ヒト脳 p oly (A) RNA (#6516-1; Clonetech社)を材料とし、RT-PCR法によりヒト脳cDNAライブラーを合成した。用いたプライマー(primer)は、リバースプライマーBAPP-6(配列番号7)、センスプライマーBAAPP-7(配列番号8)、センスプライマーBAAPP-10(配列番号9)、リバースプライマーBAAPP-12(配列番号10)で、これらを適当に組み合わせて用いることにより、NOR β を合成した。合成されたNOR β は、2%アガロースゲルによる電気泳動で分離し、単離した。このNOR β は、Xba I消化後、pGEM3Z(-)(Promega社)のXba I部位へ挿入し、この組み替えプラスミド(pGEM3Z/NOR β)を大腸菌内に増幅させ、ジデオキシ鎖終止法(dideoxy chain-termination)(Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, vol.74, p.5 463-5468, 1977)によるシーケンシングを行い、NOR β 配列が目的通り、正しいことを確認した。

【0020】D β (配列番号1と配列番号3の結合したもの)及びFAD β (配列番号1と配列番号4の結合したもの)は、基本的にNOR β と同じ構造であるが、D β はAPPアミノ酸番号618にGluからGlnへの変異を持つランゲン型の遺伝性筋肉アミロイド angiopathieで、FAD β はAPPアミノ酸番号642においてValからIleへの変異を持つ家族性アルツハイマー病に各々対応する。また、D β 及びFAD β は、そのAPPcDNA(Xang J. et al., 1987)3'側の非コード領域約30bpを含んでいる。これらは、前記ヒト脳cDNAライブラーを基にHortonらの方法に従い、PCR法で目的の配列を増幅した。D β の場合、BAAPP-10、BAAPP-6、BAAPP-7の他、リバースプライマーBAAPP-8(配列番号11)、センスプライマーBAAPP-2(配列番号12)、およびリバースプライマーBAAPP-15(配列番号13)を用いた。FAD β の場合、BAAPP-10、BAAPP-6、BAAPP-7の他、リバースプライマーBAAPP-3(配列番号14)、センスプライマーBAAPP-9(配列番号15)およびBAAPP-15を用いた。

- 【0021】 $\Delta NOR\beta$ (配列番号5のペプチドのN端にMetが付加したもの)は、17個のアミノ酸から成るシグナルペプチドがない点を除けば、基本的にNOR β と同じ構造である。 $\Delta NOR\beta$ はセンスプライマー-BAPP-13(配列番号16)およびBAAPP-12を用い、pGEM3Z/NOR β に対しPCRを行い、インサートを増幅させた。増幅された断片はpGEM3Zにクローニングされ、次いで、シーケンシングを行い、その配列の正しさを確認した。NL β (配列番号6のペプチドのN端にMetが付加したもの)は $\Delta NOR\beta$ と同様、センスプライマー-BAPP-14(配列番号17)およびBAAPP-12を用い、pGEM3Z/NOR β に対しPCRを行い、インサートを増幅させた。増幅された断片はpGEM3Zにクローニングされ、シーケンシングを行い、その配列の正しさを確認した。NL β はスウェーデン型の遺伝性アルツハイマー病に対応するもので、APPのアミノ酸番号595のLysがAsnへ、及びアミノ酸番号596のMetがLeuへ変異している。
- 【0022】一方、上記標的遺伝子を発現させるためのベクターを以下のように作成した。ニトリベータアクチングプロモーターとその上流にサイトメガロウイルスエンハンサーを有する哺乳動物発現ベクターpCAGGS (Nishimura et al., Gene, vol.108, p.193-200, 1991)より2.3kb断片をSal I/Pst I消化により切り出し、これをクローニングベクターpBluescript(Stratagene社)のSal I/Pst I部位へ挿入し、pBS-CAG-2ベクターを構築した(図1)。この2.3kb断片の中には、上記エンハンサー/プロモーターの他に、ウサギベータグロブリン遺伝子の一部(第2イントロン、第3エクソン、3'側非コード領域から成る)が含まれている。通常、cDNA等の発現させたい目的遺伝子は、第3エクソンのEco RI部位に挿入される。このpBS-CAG-2のEco RI部位に上記目的遺伝子NOR β 、FAD β 、D β 、 $\Delta NOR\beta$ 、及びNL β の各種DNA断片を挿入し、トランシージェニックマウス発現用プラスミド $p\beta\alpha/\Delta NOR\beta$ 、 $p\beta\alpha/FAD\beta$ 、 $p\beta\alpha/D\beta$ 、 $p\beta\alpha/\Delta NOR\beta$ 、及び $p\beta\alpha/NL\beta$ を構築した(図2)。マウス1細胞期胚へのDNA導入には、これら融合構造よりSal I/Bam HI消化によりトランシージョンを単離し、これを用いた。
- 【0023】尚、この構築には、DNAを消化したり、つなげたり、DNA断片を単離する等の操作が行なわれたが、このためには Maniatis T. et al (Molecular Cloning A. Laboratory Manual, 1982)の標準的DNA組み換え技術が用いられた。また、インサートの結合部周辺のDNA配列は、シーケンシングにより確認された。
- 【0024】実施例2 1細胞期胚の回収及びそれへのDNA導入

1細胞期胚は、既に雄と交配してあったB6C3F1雌マウスの輸卵管より回収した。回収した胚は前段期の初期ステージにあり、この時点では雄核と雌核とがまだ分離されており、容易に識別される。回収された胚からは周囲に存在する卵胞細胞(cumulus cell)等を除去し、適当に洗浄後、DNA注入まで一時、37°C、5%CO₂空気条件下で保存される。好ましくは、3.0 mm径バクテリオロジカルディッシュ(bacteriological dish) (No.333656, Nunc社)上、M16培養液(Whitten gham D.G., J. Reprod. Fert., vol.4, p.7-21, 1971) 5.0 μl drop (パラフィン油で覆われる)で保存される。トランシージンを含む融合構築体は、上述の方法で調製した。上述のいかなる融合構築体も、クローニングされ得、ここで述べる方法に習い、1細胞期胚に導入することができる。

【0025】次に、主にNOR β 発現ペクター(p β A/NOR β)から得られるDNAの導入について詳細に解説するが、p β A/NOR β 以外の他の融合構築体にも適用できる方法である。まず最初に、p β A/NOR β は宿主大腸菌にクローニングされ、大量増幅の後、抽出された。更に精製するため、塩化セシウムによる超遠心、続く臭化エチジウム(ethidium bromide)の除去後、透析処理に付された。こうして精製されたプラスミドは、適当な限制酵素による消化(この場合、Sal IとBam HIが用いられた)、続く0.8%アガロースゲル電気泳動により、目的のトランシージンを単離す*

p β A-NOR β トランシージンを有するトランシ

ジェニックマウスの生産効率

トランシージン	生まれた新生仔の数/移植した胚の数(%)		トランシージニックマウスの数(%)
	トランシージン	マウスの数(%)	
p β A-NOR β	120/560 (21)	35 (29)	

【0028】表1に示されるように、生まれた120匹のマウスうち、35匹はトランシージニック動物であった。これらのマウスを飼育した結果、1匹(0304)は、生後約10週目にその活発な動きが低下し、もう1匹(1102)は水頭症を発していた。他のトランシージニック動物は、生後1~30週目までは、正常様であった。これらは、すべて採材されるまでには、その配偶子が取られ、凍結保存に付された。そして、ノーザンプロット、ウエスタンプロットによりスクリーニングを行ない、発現の強い5系統(0202, 0304, 1002, 1102, 1301)を選択した。以下の解析は、主にこの5系統に関するものである。

【0029】実施例3 トランシージン由来のmRNA発現

トランシージン由来のmRNA発現は、0304, 1102等を含むp β A-NOR β トランシージニックマウスの系統においてノーザンプロット解析を行なった。トランシージニック動物及び非トランシージニックマウスの

*ことができる。こうして得られたトランシージンは、外径が約1mmの注入ビペットを使い、1細胞期胚前核へ微細注入される(Hogan B. et al., Manipulating the Mouse Embryo, 1986)。トランシージンを含む約1.0 μlのDNA溶液(約20000コピーのトランシージンが含まれる)を吸引し、雄性前核へこのDNAを注入する。注入を受けた胚は、数時間か1日間培養に付され、次いで偽妊娠D_{ay}1(ブラグ確認日をD_{ay}1と判定する)のICR仮親マウス輸卵管内へ移植される。移植を受けた仮親マウスは胎仔を出産するまで飼育される。出産後、新生仔は離乳まで1月間、仮親マウスより保育を受け、次いで、尾DNAのサザンプロット解析に付される。トランシージニック動物と判定されたF0マウス(founder)は、他の非トランシージニックマウスと交配させ、そのF1子孫を得た後(それらは卵や精子の形で凍結保存される)、生後10~30週目にすべて殺処分し、ノーザンプロット解析、病理学的解析に付した。

【0026】表1には、一つの例として、p β A-NOR β トランシージンをマウス1細胞期胚に注入して得られた結果が示されている。この中にはDNA注入後、移植されたマウス胚の数、注入された胚の移植後の生存胎仔の数、実際トランシージニック動物と判定されたF0マウス胎仔の数、等が表示されている。

【0027】

【表1】

脳を含む各種臓器より、全RNAを単離し、2.0 μgの全RNAを1.1%アガロース/1.1Mホルムアルデヒドゲル電気泳動に付し、次いで、ナイロン膜フィルターに移した。プレハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション液【5XSSC (1XSSC=0.15M NaCl, 1.5mM Na-citrate, pH 7.4)、50%ホルムアミド、5mM EDTA、5mg/mlの変性サケDNA、5X Denhardt試薬等を含む】の中で、42°Cにて2時間行った。次いで、ランダムにブライミングしたcDNAプローブ(NOR β 断片)を熱変性させた後、これをハイブリダイゼーション液に加え、ハイブリダイゼーションを行った。反応は42°Cにて18時間行った。洗浄は、0.1XSSC/0.1%SDS中、56°C、20分間行った。フィルターは-80°Cにて、24~72時間暴した(増感スクリーン+コダックXAR-5フィルム使用)。ノーザンプロット解析の一例を図3に示す。図3には、選択されたトランシージニック動物系統のうち、比較的の発現の強い0304, 1102、

及び、非トランジエニック動物のサンプルが示されている。調べた臓器は、脳、肝、腎臓、小腸、精巢である。脳では、0 3 0 4 では、内在性の A 6 9 5 mRNA (~ 3.4 kb) の量に比べ、 ~ 10 倍高いトランジーン由来 mRNA の発現 (~ 1 kb) があるが、1 1 0 2 はそれと比べると、やや低い。非トランジエニック動物は、トランジーン由来 mRNA の発現は全く見られない。同じ傾向は、他の臓器にも見られる。また、興味深いことに、トランジエニックマウスでは A 6 9 5 mRNA が増加している（例えば、1 1 0 2 及び 0 3 0 4 の肝サンプルを参照）とか、A 6 9 5 mRNA の他に A 7 5 1 (~ 3.8 kb)、及び A 7 7 0 ($\sim 3.8.5$ kb) mRNA も出現しているのが判る（例えば、1 1 0 2 及び 0 3 0 4 の脳サンプルを参照）。おそらく、外來性の NOR β の過剰発現の結果、内在性の APP mRNA のアルターナテイブスプライシングのパターンが何らかの理由で変化を起こした結果と思われる。

【0030】実施例4 ウエスタンプロット解析

β A-NOR β トランジエニック動物及び非トランジエニック動物（コントロール）のマウス脳内の APP 蛋白発現様式をウエスタンプロット解析により決定した。蛋白ホモジネイトを、Shivers B. D. (1988) の方法に基づき、脳全であるいは 3/4 から調整した。5.0 μ g 量のサンプルを 1/0.1% Tris-Tricine SDS ゲルにて電気泳動に付し、イモビルム-P メンブレン（ImmobilonTM membrane）へエレクトロプロロッティング（electroblotting）により転写させた。プロットを抗 APP 抗体 W 6 1 C [APP の C 末端側ペプチド (6 6 0番目から 6 9 5番目) に対するウサギ抗体; Shoji M. et al., 1990c] (1/500 倍) と反応させ、ECL (Amersham 社) システムによる非 RI 法による検出システムを用い、APP 蛋白の検出を試みた。

【0031】ウエスタンプロット解析の一例を図 4 に示す。図 4 には、1 1 系統のトランジエニックマウスと非トランジエニック動物の結果が示されている。即ち、これまで報告されている哺乳動物 APP isofrom の平均的のサイズに相当する約 1.20 - 1.25 kb のいくつかのバンドがコントロール及びトランジエニックマウスの脳及び各種臓器の蛋白ホモジネイト中に検出される。

更に、今回発現させたトランジーン由来の蛋白 (1.1.4 kD) がコントロールサンプルと比べ顕著に増加している。特に、高い発現 (5 ~ 6 倍) は、0 2 0 2、1 0 0 2、1 3 0 1 トランジエニック動物サンプルに見られる。しかしながら、この方法では、 β /A 4 蛋白に相当する ~ 4.2 kD のバンドは検出されず、この蛋白は調べたトランジエニック動物脳では作られていないか、あっても少ないだろうと考えられる。

【0032】実施例5 抗体を用いたマウス脳の免疫組織化学的解析

トランジーンの発現を組織、細胞レベルで詳細に解析

するため、トランジエニック動物及び非トランジエニック動物から得た脳を含む各種臓器に対し、抗 APP 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行なった。調べたマウスは、 β A-NOR β を有する 3 系統のトランジエニックマウス、及び非トランジエニックマウスである。マウスをペントバルビタールで麻酔後、脳を含む各種臓器を摘出し、4% バラホルムアルデヒド (PBS が溶媒) にて 1 日間固定後、バラフィンへ包埋し、5 μ m 厚の切片を作製した。切片は脱バラフィン後、脱水させ、0.5% 過ヨウ素酸にて 30 分処理後、正常山羊血清でブロッキングを行い、適当に希釈された抗体 (1/500) と反応させた。反応は、室温、3 時間行ない、次いでビオチン化された抗ウサギ Ig G と反応させ（室温、2 時間）、更にアビシン-ビオチンペーオキシダーゼ複合体 (avidin-biotin peroxidase complex: ABC) と反応させた。これらの反応は、製造者 (ABC K12; ベクター社, Burlingame, USA) の推薦する方法で行なった。ペーオキシダーゼは、3,3'-diamino benzidine (DAB)/NiCl₂ にて発色、可視化される。切片の核染色は、メチルグリーンにて行なった。時に、切片を抗体で反応させる前に、切片はニッスル (Nissl) 染色に付された。

【0033】 β A-NOR β -0 3 0 4 系統のトランジエニック動物脳切片と非トランジエニック動物脳切片とをニッスル染色で観察すると、このトランジエニック動物系統においては、神経細胞死が見られた。特に海馬付近の CA 3 領域を中心とした海馬錐体細胞での神経の変性、脱落が著しい。図 5 にその写真を示す。 β A-NOR β -0 3 0 4 系統のトランジエニック動物脳切片と非トランジエニック動物脳切片とを抗 APP 抗体の一つ W 6 1 C で染色すると非トランジエニック動物脳切片に比べ、トランジエニック動物脳では、免疫反応は、大脳皮質、海馬等の神経細胞に特に強く見られた。更に陽性反応は、多数の神経突起に見られた。しかし、中脳、脳幹、小脳等には、ほとんど見られなかつた。同じような所見は、他の抗体 [W 6 3 N; APP の N 末端側のペプチド (1 8 番目から 3 8 番目) に反応する抗体; Shoji M. et al., 1990c] を用いても見られた。図 6 にその写真を示す。

【0034】 β A-NOR β -0 3 0 4 系統のトランジエニック動物脳切片と非トランジエニック動物脳切片とをグリア細胞 (astrocyte) を特異的に染色する抗 GFAP (glial fibrillary acidic protein) 抗体と反応させると、トランジエニック動物脳では非トランジエニック動物に比べ、大脳皮質、海馬、前脳基底部に著明なグリア細胞の増加を認めた。図 7 にその写真を示す。グリア細胞の増加は、アルツハイマー病に相関するところ (Beach T. G. et al., Glia, vol. 2, p. 420-436, 1989)、おそらく図 5 から推測されるうるに、神経細胞の死滅後、グリア細胞がその後を埋める形で増殖したと

考えられる。 β A-NOR β -0304系統のトランジエニック動物脳切片と非トランジエニック動物脳切片とを異常構造化タウ蛋白と特異的に反応する抗体 β 1-28 (Hara Y. et al., Nature, vol. 304, p. 727-730, 1983) で切片を反応させると、トランジエニック動物脳では、この抗体と反応する構造物が海馬付近に認められた(図8(A))。このような陽性反応は非トランジエニック動物脳では認められない(図8(B))。

【0035】トランジエニックマウスの全身写真を図9に示す。図9(A)は β A-NOR β -0304トランジエニックマウス(写真中央)及び非トランジエニックマウス(写真上方)の全身写真であり、(B)は β A-NOR β -0304トランジエニックマウスの全身写真である。

【0036】

【発明の効果】本発明のトランジエニックマウスは、マウス脳内に形成される抗ベータ蛋白反応性物質、抗異常構造化タウ蛋白反応性物質等のアルツハイマー病特有のパラメーターを減少させる能力に関する薬剤の効果検定に利用できる。例えば、検定されるべき薬剤は対照動物、即ち本発明のトランジエニック動物でない動物群及び本発明のトランジエニック動物に同時に*

*投与される。この薬剤は、動物の脳内に上記パラメーターに影響を及ぼすのに充分な期間、あるいは神経細胞死を抑えるのに充分な期間を越えて連続的に投与され得るだろう。この充分な期間を経て薬剤を投与された後、トランジエニック動物及び対照の非トランジエニック動物は、供試され、脳内の解析が行われる。そして、上記パラメーターを比較することにより、薬剤の効能についてひとつの決定を下すことができる。

【0037】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 51

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

生物名: ヒト (homo sapiens)

配列の特徴:

20 他の情報: ヒトベータアミロイド前駆体のシグナルペプチド

配列

ATG CTG CCC GGT TTG GCA CTG CTC CTG CTG GCC GCC TGG ACG GCT CGG	48			
Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg				
1	5	10	15	51
GCG				
Ala				

【0038】配列番号: 2

配列の長さ: 297

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列

GAT GCA GAA TTC CGA CAT GAC TCA GGA TAT GAA GTT CAT CAT CAA AAA	48			
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys				
1	5	10	15	
TTC GTG TTC TTT GCA GAA GAT GTG GGT TCA AAC AAA GAA GGT GCA ATC ATT	96			
Leu Val Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile				
20	25	30		
GGA CTC ATG GTG GCC GGT GTT GTC ATA GGC ACA GTG ATC GTC ATC ACC	144			
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr				
35	40	45		
TTG GTG ATG CTG AAG AAG AAA CAG TAC ACA TCC ATT CAT CAT GGT GTG	192			
Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gln Val				
50	55	60		
GTG GAG GTT GAC GCC GCT GTC ACC CCA GAG GAG CGC CAC CTG TCC AAG	240			
Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys				
65	70	75	80	

17

18

ATG CAG CAG AAC GCC TAC GAA AAT CCA ACC TAC AAG TTC TTT GAG CAG 288
 Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln

85 90 95

ATG CAG AAC

297

Met Gln Asn

99

【0039】配列番号：3

配列の長さ：297

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

*起源

生物名：ヒト (homo sapiense)

配列の特徴：

10 他の情報：ヒトベータアミロイド前駆体のC末端ペプチ

ド

*

配列

GAT GCA GAA TTC CGA CAT GAC TCA GGA TAT GAA GTT CAT CAT CAA AAA 48
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

TTG GTG TTC TTT GCA GAA GAT GTG GGT TCA AAC AAA GGT GCA ATC ATT 96
 Leu Val Phe Phe Ala Gln Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20 25 30

GGA CTC ATG GTG GCC GGT GTT GTC ATA GGG ACA GTG ATC GTC ATC ACC 144
 Gly Leu Met Val Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr

35 40 45

TTG GTG ATG CTG AAG AAG AAA CAG TAC ACA TCC ATT CAT CAT GGT GTG 192
 Leu Val Met Leu Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val

50 55 60

GTG GAG GTT GAC GCC GCT GTC ACC CCA GAG GAG GGG CAC CTG TCC AAC 240
 Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys

65 70 75 80

ATG CAG CAG AAC GCC TAC GAA AAT CCA ACC TAC AAG TTC TTT GAG CAG 288
 Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln

85 90 95

ATG CAG AAC

297

Met Gln Asn

99

【0040】配列番号：4

配列の長さ：297

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ヒト (homo sapiense)

配列の特徴：

10 他の情報：ヒトベータアミロイド前駆体のC末端ペプチ

ド

40

配列

GAT GCA GAA TTC CGA CAT GAC TCA GGA TAT GAA GTT CAT CAT CAA AAA 48
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

TTG GTG TTC TTT GCA GAA GAT GTG GGT TCA AAC AAA GGT GCA ATC ATT 96
 Leu Val Phe Phe Ala Gln Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20 25 30

GGA CTC ATG GTG GCC GGT GTT GTC ATA GGG ACA GTG ATC ATC ACC 144
 Gly Leu Met Val Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Ile Ile Thr

35 40 45

19

20

TTG GTG ATG CTG AAG AAG CAG TAC ACA TCC ATT CAT CAT GGT GTG	192
Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val	
50 55 60	
GTG GAG GTT GAC GCC GCT GTC ACC CCA GAG GAG GGC CAC CTG TCC AAG	240
Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys	
65 70 75 80	
ATG CAG CAG AAC GGC TAC GAA ATT CCA ACC TAC AAG TTC TTT GAG CAG	288
Met Gln Asn Gln Asn Gln Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln	
85 90 95	
ATG CAG AAC	297
Met Gln Asn	
99	

【0041】配列番号：5

配列の長さ：309

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

*起源

生物名：ヒト (homo sapiense)

配列の特徴：

他の情報：ヒトベータアミロイド前駆体のC末端ペプチ

ド

*

配列

GAA GTG AAG ATG GAT GCA GAA TTC CGA CAT GAC TCA GGA TAT GAA GTT	48
Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val	
1 5 10 15	
CAT CAT CAA AAA TTG GTG TTC TTT GCA GAA GAT GTG GGT TCA AAC AAA	96
His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys	
20 25 30	
GGT GCA ATC ATT GGA CTC ATG GTG GGC GGT GTT GTC ATA CGC ACA GTG	144
Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Ile Ala Thr Val	
35 40 45	
ATC GTC ATC ACC TTG GTG ATG CTG AAG AAC CAG TAC ACA TCC ATT	192
Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile	
50 55 60	
CAT CAT GGT GTG GTG GAG GTT GAC GCC GCT GTC ACC CCA GAG GAG GGC	240
His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg	
65 70 75 80	
CAC CTG TCC AAG ATG CAG CAG AAC GGC TAC GAA ATT CCA ACC TAC AAG	288
His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gln Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys	
85 90 95	
TTC TTT GAG CAG ATG CAG AAC	309
Phe Phe Glu Glu Met Gln Asn	
100 103	

【0042】配列番号：6

配列の長さ：309

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ヒト (homo sapiense)

配列の特徴：

他の情報：ヒトベータアミロイド前駆体のC末端ペプチ

ド

配列

GAA GTG AAT CTG GAT GCA GAA TTC CGA CAT GAC TCA GGA TAT GAA GTT	48
Glu Val Asn Leu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val	
1 5 10 15	

21

22

CAT CAT CAA AAA TTG GTG TTC TTT GCA GAA GAT GTG GGT TCA AAC AAA	96
His His Gln Lys Leu Val Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys	
20 25 30	
GGT GCA ATC ATT GGA CTC ATG GTG GGC GGT GTT GTC ATA GCG ACA GTG	144
Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val	
35 40 45	
ATC GTC ATC ACC TTG GTG ATG CTG AMG AMG AAA CAG TAC ACA TCC ATT	192
Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Glu Tyr Thr Ser Ile	
50 55 60	
CAT CAT GGT GTG GTG GAG GTT GAC GGC GCT GTC ACC CCA GAG GAG CGC	240
His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg	
65 70 75 80	
CAC CTG TCC AAG ATG CAG CAG AAC GGC TAC GAA AAT CCA ACC TAC AAG	288
His Leu Ser Lys Met Glu Glu Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys	
85 90 95	
TTC TTT GAG CAG ATG CAG AAC	309
Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn	
100 103	

【0043】配列番号：7

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

*起源：なし

20 生物名：なし

株名：なし

配列の特徴：リバースプライマーDNA。BAPP-6と名付けた。

*

配列

TTCGGATCC GCGCGAGCCG TCGAGG

26

【0044】配列番号：8

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

*起源：なし

生物名：なし

株名：なし

30 配列の特徴：センスプライマーDNA。BAPP-7と名付けた。

*

配列

GCTCGGGCGG ATTCGAGAATT CGGACATCA

29

【0045】配列番号：9

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

★起源：なし

生物名：なし

株名：なし

配列の特徴：センスプライマーDNA。BAPP-10と名付けた。

★40

配列

CTCTAGAGAT GCTGCCCGT TTGGCC

25

【0046】配列番号：10

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

起源：なし

生物名：なし

株名：なし

配列の特徴：リバースプライマーDNA。BAPP-12と名付けた。

配列

GGCTCTAGAG CATGTTCTGC ATCTGCTCAA

30

【0047】配列番号: 11

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

GTCTTGTGCA AAGAACACCA A

【0048】配列番号: 12

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

TTGGTGTCT TTGCAACAGA T

【0049】配列番号: 13

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

GGATCCAACT TCAGAGGCTG CIGT

【0050】配列番号: 14

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

GGTGTATGATG ATCACTGTGC C

【0051】配列番号: 15

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

GGCACAGTGA TCATCATCAC C

【0052】配列番号: 16

配列の長さ: 38

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

GGCTCTAGAG ATGGAAGTGA AGATGGATGC AGAATTC

【0053】配列番号: 17

配列の長さ: 38

*起源: なし

生物名: なし

株名: なし

配列の特徴: リバースプライマー-DNA。BAPP-8と名付けた。

*

※起源: なし

10 生物名: なし

株名: なし

配列の特徴: センスプライマー-DNA。BAPP-2と名付けた。

※

★起源: なし

生物名: なし

株名: なし

20 配列の特徴: リバースプライマー-DNA。BAPP-15と名付けた。

★

★起源: なし

生物名: なし

株名: なし

配列の特徴: リバースプライマー-DNA。BAPP-3と名付けた。

☆30

◆起源: なし

生物名: なし

株名: なし

配列の特徴: センスプライマー-DNA。BAPP-9と名付けた。

◆

*起源: なし

生物名: なし

株名: なし

配列の特徴: センスプライマー-DNA。BAPP-13と名付けた。

*

配列の型: 核酸

50 鎖の数: 一本鎖

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸
起源：なし
生物名：なし

配列

GGCTCTAGAG ATGGAAGTGA ATCTGGATGC AGAATTCC

*株名：なし
配列の特徴：センスプライマー-DNA。BAPP-14と名付けた。

*

【図面の簡単な説明】

【図1】サイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリペータアクチングロモーターを有するプラスミドpBs CAG-2のプラスミドマップを表した図である。

【図2】サイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリペータアクチングロモーターとNOR β 、D β 、FAD β 、 Δ NOR β 及びNL β とを結合した各種トランシージーンを表わした図である。

【図3】 β A-NOR β トランシージェニックマウス(1 102, 0 304)及び非トランシージェニックマウスから採取した各種組織の全RNAのノーザンプロット解析結果を示した図である。分子量のサイズはKで示され、分子量マーカーは図の右側に記されている。

【図4】 β A-NOR β トランシージェニックマウス及び非トランシージェニックマウスから採取した脳抽出物のウエスタンプロット解析を示した図である。用いた抗体は抗APP抗体W6 1 Cである。

【図5】(A)は β A-NOR β -0 304トランシージェニック動物脳、そして(B)は非トランシージェニックマウ

ス脳の海馬領域におけるニッスル染色を表わした写真である。

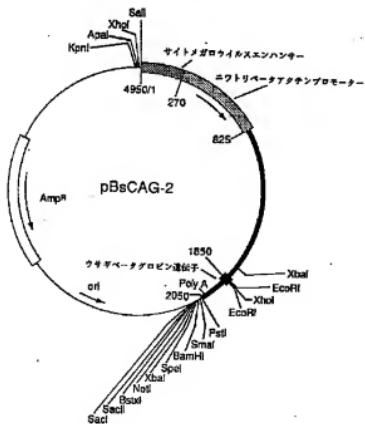
【図6】(A)は β A-NOR β -0 304トランシージェニック動物脳、そして(B)は非トランシージェニックマウス脳における抗APP抗体W6 1 Cによる免疫反応産物の顕微鏡写真である。

【図7】(A)は β A-NOR β -0 304トランシージェニック動物脳、そして(B)は非トランシージェニックマウス脳における抗GFAP抗体による免疫反応産物の顕微鏡写真である。

【図8】(A)は β A-NOR β -0 304トランシージェニック動物脳、(B)は非トランシージェニックマウス脳における抗タウ抗体 β 1-28による免疫反応産物の顕微鏡写真である。

【図9】(A)は β A-NOR β -0 304トランシージェニックマウス及び非トランシージェニックマウスの全身写真であり、(B)は β A-NOR β -0 304トランシージェニックマウスの全身写真である。

【図1】

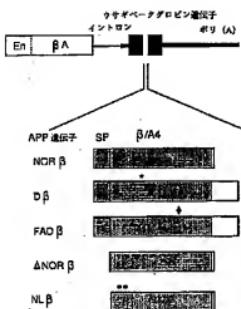


【図4】



- | | |
|----|------------------------|
| 1 | トランシージェニック動物 (0 2 0 2) |
| 2 | トランシージェニック動物 (0 3 0 5) |
| 3 | トランシージェニック動物 (0 4 0 1) |
| 4 | トランシージェニック動物 (0 6 0 4) |
| 5 | トランシージェニック動物 (1 0 0 2) |
| 6 | トランシージェニック動物 (1 0 0 4) |
| 7 | トランシージェニック動物 (1 3 0 1) |
| 8 | トランシージェニック動物 (1 3 0 3) |
| 9 | トランシージェニック動物 (1 4 0 2) |
| 10 | トランシージェニック動物 (1 5 0 1) |
| 11 | トランシージェニック動物 (1 5 0 4) |
| 12 | 非トランシージェニック動物 |

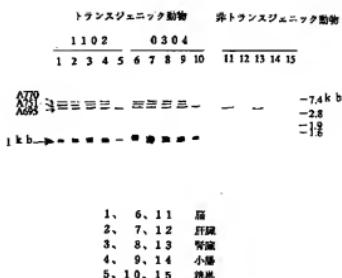
【図2】



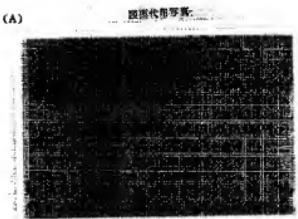
EN : サイトメゴロウシスエンハンサー
 BA : ブラックペーパーチャンプロモーター
 AP : APPデータインフレ
 SP : シグナルペナルティ
 PA : RNA表面に対応するAPPのC-末端抗体

- コドン2-2位におけるGln-Gln重複
- コドン5-5位におけるVal-Ala重複
- コドン3-3位におけるCys-Ala組合せヨウコドン4位におけるMet-Lys重複

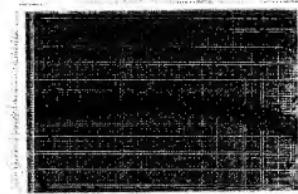
【图3】



【四五】



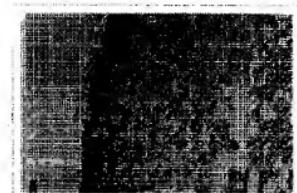
100



【図6】

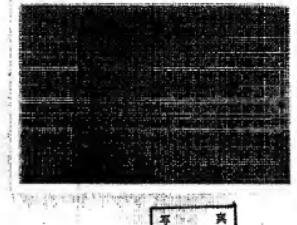
(A)

倒置代用字母



(B)

倒置代用字母



【図7】

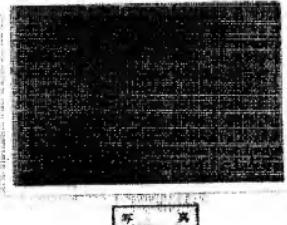
(A)

倒置代用字母



(B)

倒置代用字母

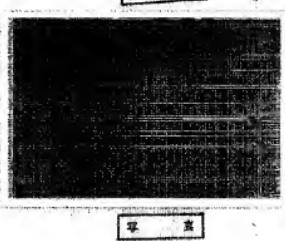


【図8】

(A)

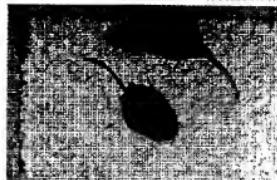


(B)

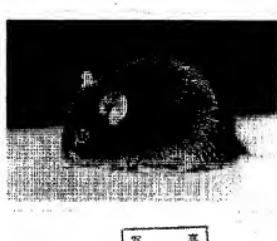


【図9】

(A)



(B)



フロントページの続き

(72)発明者 東海林 幹夫
群馬県群馬郡群馬町北原699番地

(72)発明者 瓦林 級
群馬県前橋市青梨町1345番地19号